

Özgün Araştırma/Original Article

Analitik Metot Verifikasyonunda İç İçe Tasarım Yaklaşımı: Kuru İncirlerde Aflatoksin Örneği

Nested Design Approach in Analytical Method Verification: Aflatoxin Example in Dried Figs

Tarık Yörükoğlu¹, Hakan Yavaş^{2*}, Canan Aydın³, Mehmet Yaşar Özkara⁴

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fak., Gıda Mühendisliği Bölümü, KAHRAMANMARAŞ/TÜRKİYE

² Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü BURSA/TÜRKİYE,

³ Gıda Mühendisi, Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü GAZİANTEP/TÜRKİYE

⁴ Gıda Mühendisi, Gaziantep Ticaret Borsası Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı GAZİANTEP/TÜRKİYE

(Yazar sıralamasına göre)

ORCID ID: 0000-0001-8507-708X, Dr. Öğr. Üyesi.

ORCID ID: 0000-0003-3435-2699, Ziraat Mühendisi

ORCID ID: 0000-0003-1931-0511, Gıda Mühendisi

ORCID ID: 0000-0003-3006-9431, Gıda Mühendisi

*Sorumlu yazar/Corresponding author: yavashakan@tarimorman.gov.tr

Geliş Tarihi : 10.12.2024

Kabul Tarihi : 06.01.2025

Öz

Amaç: Bu çalışma, kuru incirlerde aflatoksin analizine yönelik kullanılan analitik yöntemlerin doğruluğunu, güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla iç içe tasarım (nested design) yaklaşımını incelemektedir. Analitik yöntemlerin güvenilir sonuçlar verebilmesi için verifikasyon süreçleri büyük önem taşımaktadır. Nested design, laboratuvar koşullarında farklı faktörlerin varyans üzerindeki etkilerini ANOVA yöntemi ile analiz ederek metodun sağlamlığını ve kesinliğini aynı anda verebilmektedir.

Materyal ve yöntem: Aflatoksin analizi, AOAC Official Method 999.07'nin modifiye edilmiş bir versiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon, ekstraksiyon ve çözelti oranlarında yapılan değişiklikleri kapsamaktadır. Analizler, HPLC-FLD cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada cihaz performansı, standart analiz testleri ve matris etkileri gibi parametreler detaylı bir şekilde incelenmiştir. Deneyler; farklı operatörler, cihazlar ve günlerde gerçekleştirilmiş, veriler ANOVA ile analiz edilerek tekrarlanabilirlik (RSDr) ve tekrarüretilebilirlik (RSDR) hesaplamaları yapılmıştır. Ayrıca yöntem performansı, düşük ve yüksek aflatoksin seviyelerinde test edilmiştir.

Tartışma ve sonuç: Sonuçlar, modifiye yöntem ile orijinal yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ($t < t_{kritik}$; $t_{kritik} = 2.228$) ve modifiye metodun güvenilir olduğunu ortaya koymuştur. Kalibrasyon eğrisi için elde edilen R^2 değeri 0.9996 olup, yöntem yüksek bir doğruluk sağlamıştır. Limit of Detection (LOD) değeri 0.5 µg/kg, Limit of Quantification (LOQ) değeri ise 1.0 µg/kg olarak hesaplanmıştır. Toplam aflatoksin analizinde modifiye yöntem ile ölçülen değerler % 92.89-91.05 geri kazanım oranı sağlamış ve bu oran yasal sınırların (%80-110) içinde kalmıştır. İç içe Tasarım (Nested design) yaklaşımı ile elde edilen değerler sırasıyla; Sr (Tekrarlanabilirlik Standart Sapması): 0.015, SR (Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması): 0.045, %RSDr (Tekrarlanabilirlik Bağlı Standart Sapma): 1.683, %RSDR (Tekrarüretilebilirlik Bağlı Standart Sapma): 5.036'dır. Çalışma, iç içe tasarım analitik yöntem verifikasyonunda etkin bir araç olduğunu ve matris etkisi yüksek ürünlerde başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: İncir; aflatoksin; metot verifikasyonu; iç içe tasarımı

Abstract

Objective: This study aims to evaluate the accuracy, reliability, and repeatability of analytical methods used for aflatoxin analysis in dried figs through the nested design approach. Verification processes are critical to ensuring that analytical methods produce reliable results. The nested design statistically analyzes the effects of various factors on variance using the ANOVA method, providing both the robustness and precision of the method simultaneously.

Material and methods: Aflatoxin analyze was conducted using a modified version of AOAC Official Method 999.07. The modifications included adjustments in extraction and solvent ratios. Analyses were performed using an HPLC-FLD system. Parameters such as device performance, standard analysis tests, and matrix effects were thoroughly examined. Experiments were conducted under different conditions, including variations in operators, devices, and days. Data were analyzed using ANOVA, and repeatability (RSDr) and reproducibility (RSDR) calculations were performed. The method's performance was also tested at low and high aflatoxin levels.

Results and conclusion: The results showed no statistically significant difference between the original and modified methods ($t < t_{critical}$; $t_{critical} = 2.228$), confirming the reliability of the modified method. The calibration curve yielded an R^2 value of 0.9996, demonstrating high accuracy. The Limit of Detection (LOD) was calculated as 0.5 µg/kg, and the Limit of Quantification (LOQ) was 1.0 µg/kg. Recovery rates in total aflatoxin analysis using the modified method ranged between 92.89% and 91.05%, falling within the legal limits of 80-110%. The values obtained through the Nested Design approach were as follows: Sr (Repeatability Standard Deviation): 0.015, SR (Reproducibility Standard Deviation): 0.045, %RSDr (Relative Standard Deviation for Repeatability): 1.683, and %RSDR (Relative Standard Deviation for Reproducibility): 5.036. This study demonstrated that the nested design is an effective tool for verifying analytical methods and can be successfully applied to products with high matrix effects.

Keywords: Fig, aflatoxin, method verification, nested design

1. Giriş

Kimyasal analizlerde metot verifikasyonları önem arz etmektedir. Doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir analitik sonuçlar elde etmek için, kullanılan analiz yöntemlerinin performansının kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi ve doğrulanması gerekmektedir (Rao ve Srinivas, 2015). Metotların doğrulanması, TS EN ISO/IEC 17025:2017 standardının 7.2.1.5 maddesinde belirtilen bir gerekliliktir. Bu maddede, laboratuvarın yöntemlerin düzgün bir şekilde çalıştığını ve gereken performansın elde edilebildiğini doğrulaması gerektiği belirtilmektedir. Eğer yöntem yayımlayan kuruluş tarafından güncellenirse, doğrulama çalışmalarının gerekli ölçüde tekrarlanması gerekmektedir. Bu ifade, laboratuvarın yöntemlerin doğrulanması için bazı deneysel çalışmalar yapması gerektiğini göstermektedir. Doğrulama çalışmaları, laboratuvar koşullarında yapılan deneysel çalışmalarını içermekte olup, yayımlanmış metot performans parametrelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde elde edilebildiğini kanıtlamayı amaçlamaktadır (Anonim, 2018a, TÜRKAK, 2023).

Doğrulama çalışmaları, laboratuvarın yeni geliştirilmiş bir yöntemi geçerli kılmaya kıyasla daha az iş yükü gerektirmektedir. Bununla birlikte, doğrulama çalışmaları yeterli ve kapsamlı olmalıdır, böylece geçerli kılınmış yöntemin yayınlanmış performans parametrelerini elde edebileceğini istatistiksel olarak kanıtlanabilir (TÜRKAK, 2022).

Analitik metot validasyonu ve verifikasyonu, analitik yöntemlerin doğruluğunu, hassasiyetini ve güvenilirliğini değerlendirmek için kullanılan süreçlerdir. Analitik metot validasyonu ve verifikasyonun bazı yaygın çeşitleri (EURACHEM/CITAC, 2012) Çizelge 1'de verilmiştir.

Bu çeşitler, analitik metot validasyonu ve verifikasyonu sürecinin temel bileşenlerini kapsamaktadır. Ancak, analizin türüne ve spesifik gerekliliklere bağlı olarak farklı çeşitler ve parametreler de değerlendirilebilir (Anonim 2018a, Anonim 2018b, TÜRKAK, 2023, B. Magnusson ve U. Örnemark, 2014).

Kimyasal analizlerde metot verifikasyonlarında iç içe tasarım yaklaşımı (nested design), analitik metodun doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak için farklı seviyelerde testlerin uygulanmasını

içerir. Bu yaklaşım, her seviyede elde edilen verilerin bir sonraki seviye için temel oluşturduğu bir hiyerarşik yapıyı takip eder.

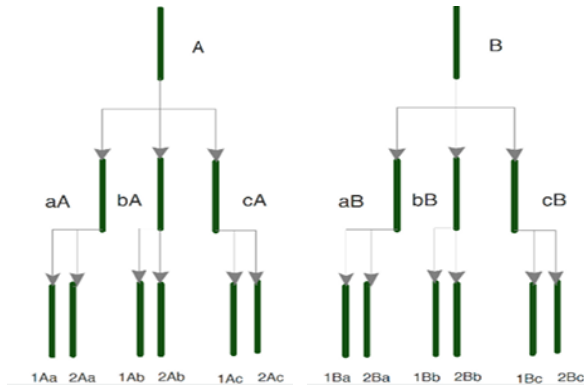
Çizelge 1. Analitik Yöntem Performans Parametreleri.

Terminoloji	Tanım
Doğruluk (Accuracy)	Analitik yöntemin gerçek değerlere ne kadar yakın ölçümler gerçekleştirdiğini değerlendirir. Gerçek değerlere yakın ölçüm sonuçları elde etmek hedeflenir.
Hassasiyet (Precision)	Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğini ve tutarlılığını değerlendirir. Aynı örneği tekrarlayan ölçümlerin tutarlılığı incelenir.
Belirlilik Sınırı (LOD)	Analitik yöntemin, analitin en düşük tespit edilebilir derişimini belirleme yeteneğini değerlendirir.
Ölçüm Aralığı (Range)	Analitik yöntemin doğru ve güvenilir sonuçlar elde edebileceği derişim aralığını belirler. Minimum ve maksimum derişimleri kapsar.
Kesinlik (Specificity)	Analitik yöntemin, analiti diğer bileşenlerden etkilenmeden doğru şekilde ölçebilme yeteneğini değerlendirir.

Kimyasal analizlerde iç içe tasarım yaklaşımının seviyeleri Çizelge 2 de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Analitik Metot Doğrulama Seviyeleri ve Açıklamaları.

Test Türü	Açıklama
Cihaz Performans Testleri	Analitik cihazların (örneğin, spektrometreler, kromatograflar) doğru çalışıp çalışmadığını kontrol eder. Kalibrasyon, doğrusalılık, tekrarlanabilirlik ve sınır değerleri test edilir.
Standart Analiz Testleri	Analiz yöntemindeki her adım standart maddeler veya örnekler kullanılarak test edilir. Örneğin, ekstraksiyon veya türetme reaksiyonlarının verimliliği kontrol edilir.
Matris Etkisi Testleri	Gerçek örneklerin matris etkileri (girişim yapan bileşikler, pH, iyon gücü) dikkate alınarak test yapılır. Gerçek örneklerle yakın koşullarda yöntemin performansı değerlendirilir.
Kesinlik Testleri	Yöntemin tekrarlanabilirliği (aynı cihaz ve analist) ve tekrar üretilebilirliği (farklı cihazlar ve analistler) test edilir. Aynı numunelerin tekrar analizleriyle kesinlik belirlenir.
Doğruluk Testleri	Yöntemin doğruluğu, sertifikalı referans maddeler veya alternatif referans yöntemlerle karşılaştırılarak değerlendirilir. Geri kazanım deneyleri veya katma maddesi testleri uygulanır.
Rutin Örnekler Üzerinde Doğrulama	Metot, gerçek rutin örnekler üzerinde test edilerek performansı doğrulanır. Metot validasyon parametrelerinin tümü bu aşamada değerlendirilir.



Şekil 1. İç İçe Deney Tasarımı (TÜRKAK, 2022).

Şekil 1'de gösterilen iç içe (nested design) deneysel tasarım, genellikle varyans bileşenlerinin değerlendirilmesinde kullanılır. Bu nedenle, geçerli kılma çalışmalarında kesinliğin tespiti, laboratuvar numunesinin homojenliğinin kontrolü ve numune alma çalışmalarında sıklıkla uygulanır. Laboratuvar numunesinin homojenliğini istatistiksel olarak kanıtlamak için, homojen laboratuvar numunesinden alınan bir dizi numune ile bu numunedan alınan alt numuneler ve tekrar analizleri için hiyerarşik bir iç içe desen oluşturulur.

Dengeli bir iç içe deneysel tasarımda, aynı seviyedeki gruplardan eşit sayıda gözlem yapılması planlanır. İç içe deneysel tasarım, tek

veya iki etkenli ANOVA ile incelenir (TÜRKAK, 2022).

2. Materyal ve yöntem

Bu çalışmada, kuru incirde Aflatoksin B₁ ve Toplam Aflatoksin analizi Kuru Meyvelerde Aflatoksin Analizi AOAC Official Method 999.07'den modifiye edilmiş yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilen aşamalar; Orijinal metotta ekstraksiyon için kullanılan 300 mL (240+60) MeOH-H₂O miktarı, 200 mL (160+40) olarak değiştirilmiş, Süzüntüden alınan 10 mL ve üzerine ilave edilen 60 mL PBS, 10 mL üzerine 40 mL ultra saf su olarak değiştirilmiş ve 3 mL'ye tamamlanan son hacim 2 mL'ye tamamlanmıştır. Yapılan bu değişiklikler için doğrulama çalışması olarak incir numunesine 5,2 ppb'lik spike yapılarak her iki metot ile çalışılmıştır. Çalışma sonucu Çizelge 3'te detaylı olarak verilmiş ve istatistiksel olarak orijinal metot ile modifiye edilmiş metot arasında t-testi yapılmıştır (Çizelge 4). Her durumda, mutlak t-değeri kritik t-değerinden ($t_{crt}=2,228$) daha küçük olduğundan, iki metodun sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu durum, modifiye metodun orijinal metotla uyumlu olduğunu ve benzer sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Çizelge 3. Orijinal ve Modifiye Yöntemlerin Kuru İncir Örneğindeki Aflatoksin Sonuçları (ppb).

AFL G2 (0,6 ppb)		AFL G1 (2 ppb)		AFL B2 (0,6 ppb)		AFL B1 (2 ppb)		AFL TOPLAM (5,2 ppb)	
Orijinal	Modifiye	Orijinal	Modifiye	Orijinal	Modifiye	Orijinal	Modifiye	Orijinal	Modifiye
0,543	0,574	1,895	1,876	0,557	0,557	1,913	1,913	4,907	4,957
0,587	0,573	1,959	1,852	0,606	0,568	1,912	1,913	5,064	4,948
0,540	0,556	1,858	1,877	0,567	0,583	1,928	1,907	4,894	5,000
0,587	0,576	1,864	1,880	0,581	0,571	1,969	1,873	5,001	4,900
0,561	0,565	1,832	1,835	0,555	0,548	1,803	1,923	4,751	4,871
0,536	0,571	1,912	1,848	0,556	0,568	1,835	1,892	4,839	4,912

Çizelge 4. Orijinal ve Modifiye Yöntemlerin İstatistiksel Karşılaştırma Sonuçları (t-Test).

AFB1	t= -0,445	tcrt=2,228	t<tcrt	UYGUN
AFB2	t= -0,471	tcrt=2,228	t<tcrt	UYGUN
AFG1	t= 1,265	tcrt=2,228	t<tcrt	UYGUN
AFG2	t= -1,017	tcrt=2,228	t<tcrt	UYGUN
Toplam AF	t= -0,445	tcrt=2,228	t<tcrt	UYGUN

Çizelge 5'te çalışmada kullanılan yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının marka-model ve analiz çalışma koşulları gösterilmiştir.

Çizelge 5. HPLC Cihazı Konfigürasyonu ve Analiz Çalışma Şartları.

Ekipman	Marka-Model	Şartlar
HPLC	Dionex Ultimate	
Pompa	Dionex P680	1 ml/dak. <300 bar
Oto Örnekleyici	Dionex ASI-100	100 µL
Dedektör	Dionex RF 2000	Ex: 360nm; Em: 440nm
Kolon Fırın	TCC-100	25 °C
Yazılım	Packer Bell, Chromeleon	
Kolon	Avantor ACE, C18 -250 mm-5µm- 4,6 mm	

2.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Sodyum Klorür (7647-14-5), asetonitril (75-05-8), metanol (67-56-1) kimyasalları HPLC grade saflıkta, potasyum bromür (7758-02-3) %99,5 ve nitrik asit (7697-37-2) %65. Triology Aflatoksin B1, B2, G1, G2 kuru kristal toz standart kullanılmıştır.

2.2. Örneklerin hazırlanması

Kuru incir numuneleri, Silverson laboratuvar cihazı kullanılarak homojenize edilmiş ve analize hazırlanmıştır. Bu işlemde, 1000 mL'lik bir blender kabına 50 ±0.01 g numune tartılmış ve üzerine 5 g NaCl, 100 mL saf su ve 150 mL MeOH ilave edilerek 2 dakika boyunca yüksek devirde karıştırılmıştır. Karışım, cam huni ve ardından kaba filtre kağıdı ile Whatman No:4 filtre kağıdından süzülerek filtrat elde edilmiştir. Filtrattan 20 mL pipetle alınarak, üzerine 20 mL PBS (8.1.) solüsyonu veya saf su eklenmiş ve 1:100'lük bir mezürde karıştırılmıştır.

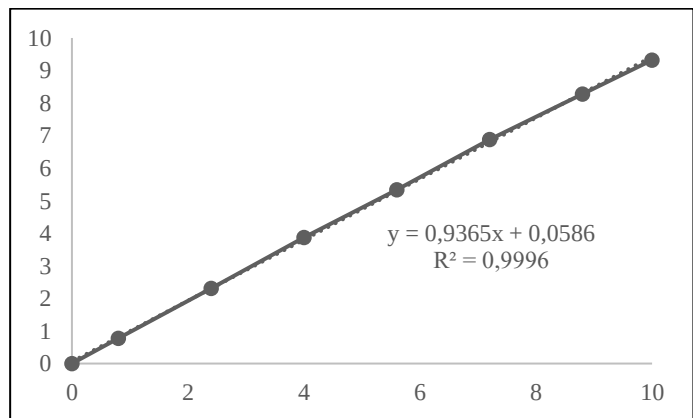
Sonrasında, IAC kolonunun mavi kısmı çıkarılmış, uç kısmı kesilmiş ve tekrar takılarak kolon

enjektöre sabitlenmiştir. Pipetle alınan 10 mL ekstrakt (kabuklu numunelerde 20 mL), kolondan saniyede 1 damla olacak şekilde geçirilmiştir. Ardından, kolon iki kez 10 mL saf su ile yıkanmış ve akış hızı 5 mL/dk'yı aşmayacak şekilde düzenlenmiştir. Kolondan su tamamen çıkarıldıktan sonra, 1 mL MeOH kolona eklenerek yavaşça geçirilmiş ve 15 mL'lik koyu renkli bir vialde toplanmıştır. Daha sonra, işlem 1 mL saf su kullanılarak tekrarlanmış ve bu su da aynı vialde birleştirilerek toplam hacim 2 mL'ye ulaşmıştır. Karışım, vorteks cihazında iyice karıştırıldıktan sonra 2 mL'lik bir vialde enjeksiyona hazır hale getirilmiştir (AOAC, 2003).

3. Tartışma

Aflatoksin analizinde doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için doğrulama süreçleri büyük önem taşır (Williams & Zhao, 2019). Metodun geçerliliğini belirlemek için örnek körü, bilinen konsantrasyonlardaki örnekler, referans materyalleri veya kirlenmiş numuneler kullanılabilir. ISO 11095 standardına göre, metot çalışması için en az üç farklı konsantrasyon seviyesinde ya da ilgili mevzuatın belirlediği seviyelerde standart çözeltilerle en az iki kez tekrarlanan analizler yapılmalıdır. Bu analizlerin her biri, metot uygulandıktan sonra en az iki defa cihazda ölçülmelidir. Şekil 2'de Aflatoksin B1 için çizilen kalibrasyon grafiği R^2 (0,9996) değeri, kalibrasyon noktaları ve HPLC'de gelen alan büyüklükleri görülmektedir. Şekil 6'da ise elde edilen kalibrasyon grafiğinin ölçüm belirsizliğinin nasıl hesaplanacağını gösteren formülasyon yer almaktadır. Hesaplamalar sonucunda Kalibrasyon grafiğinden gelen genişletilmiş belirsizlik bütçesi $U(x)=0,012$ olarak hesaplanmıştır.

	A Conc. (ppb)	B Area
1	0	0
2	0,8	0,7743
3	2,4	2,3115
4	4	3,8788
5	5,6	5,3444
6	7,2	6,8878
7	8,8	8,2824
8	10	9,3239

**Şekil 2.** Aflatoksin B1 HPLC Cihazı Kalibrasyon Grafiği.

Çoğu modern analitik yöntem için LOD, yöntem saptama sınırı (MDL) ve enstrümantal saptama sınırı (IDL) olmak üzere iki bileşene ayrılabilir. MDL, belirli analitlerin analizi için geliştirilen ekstraksiyon ve analiz yöntemlerine uygulanması gereken bir terimdir. MDL, belirli bir matris için (belirli bir yöntemle) güvenilir bir şekilde tespit

edilebilen veya arka plandan ayırt edilebilen bir analitin en küçük miktarı veya konsantrasyonu olarak tanımlanabilir. Başka bir deyişle LOD, bir yöntemle ölçülen ve kendisiyle ilişkilendirilen belirsizlikten daha büyük olan en düşük değerdir (Taylor, 1989). MDL belirlenirken tüm matris girişimleri dikkate alınmalıdır (NATA, 2012).

Çizelge 6. Kalibrasyonda Gelen Ölçüm Belirsizliği Hesaplama Formülü

$u(x_0) = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x}_{\text{hesaplanan}})^2}{S_{xx}}}$		
S	0,061	Lineer kalibrasyon standart belirsizliği ($u(x_0)$) yukarıdaki formüle göre hesaplanır.
b	0,9365	
p	1	
n	10	$u(x_0)$: Kalibrasyon standart belirsizliği
x_0	5,6	S: Residuel standart sapma
X hesaplanan	4,85	b: Kalibrasyon doğrusunun eğimi
S_{xx}	94,88	p: Her bir konsantrasyon için okuma sayısı
Kalibrasyon Belirsizlik		n: Toplam okuma sayısı
$u(x_0)$	0,068	x_0 : kalibrasyon aralığının ortasına denk gelen bir konsantrasyon değeri alınır.
x_0	5,6	X hesaplanan: Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalaması
u (K)	0,012	S_{xx} : sample corrected sum of squares değeridir.

Codex Alimentarius Komisyonu Prosedür El kitabına göre yöntemin belirtilen hüküm, belirtilen ürün ve belirtilen seviye(ler) (maksimum ve/veya minimum) (ML) için geçerli olması gerekir. Yöntemin uygulanabilir minimum aralığı, değerlendirilecek belirlenen seviyeye (ML) bağlıdır ve tekrar üretilebilirlik standart sapması (SR) veya LOD ve LOQ cinsinden ifade edilebilir denmektedir. El kitabına göre uygulanabilir minimum aralığın belirlenmesine alternatif olarak kriterler LOD ve LOQ için sayısal değerler olabilir. Bu kapsamda LOD için sayısal değer şu şekilde hesaplanabilir: 0,1 mg/kg veya üzerindeki seviyeler için belirtilen ML'nin 1/10'undan fazla olmamalı veya 0,1 mg/kg'ın altındaki seviyeler için belirtilen ML'nin 1/5'inden fazla olmamalıdır. Aynı

şekilde LOQ'nun sayısal değeri şu şekilde hesaplanabilir: 0,1 mg/kg veya üzerindeki seviyeler için belirtilen ML'nin 1/5'inden fazla olmamalı veya 0,1 mg/kg'ın altındaki seviyeler için belirtilen ML'nin en fazla 2/5'i. kadar olmalıdır (FAO ve WHO, 2023).

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Tebliği (2023/11) kuru incir numunelerinde Toplam Aflatoksin maksimum izin verilen limit değeri 10 µg/kg olarak belirlenmiştir (Çizelge 7). Metot verifikasyon çalışmamızda LOD ve LOQ değeri hesaplanmasında 10 µg/kg Toplam Aflatoksin değeri baz alınarak hesaplama yapılmıştır (Anonim, 2023).

Limit of detection (LOD):

For $ML \geq 0,1 \text{ mg/kg}$, $LOD \leq ML \cdot 1/10$

For $ML < 0,1 \text{ mg/kg}$, $LOD \leq ML \cdot 1/5$

Limit of quantification (LOQ):

For $ML \geq 0,1 \text{ mg/kg}$, $LOQ \leq ML \cdot 1/5$

For $ML < 0,1 \text{ mg/kg}$, $LOQ \leq ML \cdot 2/5$

Çizelge 7. Türk Gıda Kodeksi Buluşanlar Yönetmeliği Antep Fıstığı Aflatoksin Limit Değerleri, (Anonim, 2023).

LOD ve LOQ				
Max Limit (µg/kg)	10,00 (Toplam Aflatoksin)			
LOD ≤ 1/5 ML	2,0 µg/kg			
LOQ ≤ 2/5 ML	4,0 µg/kg			
LOD	AFB1	0,5	AFG1	0,5
	AFB2	µg/kg	AFG2	µg/kg
LOQ	AFB1	1 µg/kg	AFG1	1 µg/kg
	AFB2		AFG2	

Geri kazanım çalışmaları, sertifikalı referans malzeme, belirlenmiş referans metodoloji ve yeterlilik testi mevcut olmayan durumlar için uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemin en önemli yararı, analizlerin orijinal matris üzerinde, yani testin gerçekleştirildiği gerçek örnek üzerinde yapılabilmesidir. Geri kazanım çalışması sırasında, analiz edilecek madde orijinal matrise eklenerek zenginleştirilir. Ancak, bu yöntemin dezavantajı, zenginleştirme işlemi sırasında, örneklerdeki

analitlerin orijinal örneklerdeki gibi güçlü fiziksel ve kimyasal bağlara sahip olmamasıdır. Bu, dışarıdan eklendiği için, analitlerin matrisle aynı güçlü bağları oluşturamamasıdır. Buna rağmen, geri kazanım çalışmaları genellikle daha doğru sonuçlar üretmektedir.

Başarılı bir geri kazanım oranı, aksi belirtilmediği sürece, %80 ile %110 arasında değişen sonuçlarla tanımlanır, Çizelge 8’de verilen aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G_a için geri kazanım değerleri yasal mevzuatın belirttiği sınır değerler arasında kaldığı görülmektedir. Sonuçların konsantrasyona göre değişebileceği göz önünde bulundurularak, yasal sınırlamaların olduğu durumlarda düşük konsantrasyonlarda da testler yapılmalıdır. Eurachem kılavuzu, etkin bir geri kazanım çalışmasının en az altı tekrar içermesi gerektiğini önerir ve çalışmaların, farklı konsantrasyon seviyelerinde, ölçüm aralığına uygun şekilde gerçekleştirilmesi tavsiye edilir (Yılmaz, 2012).

Çizelge 8. Kuru İncir Aflatoksin Geri Kazanım Değerleri.

Analist	Okunan Değer				Hesaplanan (%)			
	G2	G1	B2	B1	G2	G1	B2	B1
1	0,30	0,90	0,25	0,89	99,67	90,10	84,67	88,90
	0,28	0,91	0,27	0,90	93,67	90,80	90,67	89,70
2	0,28	0,90	0,26	0,90	94,33	89,50	87,33	90,10
	0,29	0,87	0,26	0,88	97,67	87,40	87,67	88,20
3	0,29	0,87	0,27	0,90	95,67	86,50	89,67	89,80
	0,29	0,90	0,26	0,89	98,00	89,90	88,00	88,50
4	0,28	0,93	0,27	0,94	92,33	92,60	90,33	93,80
	0,25	0,87	0,26	0,94	84,67	87,20	85,67	94,20
5	0,26	0,88	0,26	0,92	87,33	88,00	85,33	91,60
	0,29	0,90	0,26	0,93	95,00	90,10	85,00	93,00
6	0,25	0,92	0,26	0,93	83,33	92,10	88,00	93,00
	0,28	0,88	0,28	0,92	93,00	87,70	93,67	91,80
Ortalama	0,28	0,89	0,26	0,91	92,89	89,33	88,00	91,05
Standart Sapma	0,02	0,02	0,01	0,02	5,22	1,97	2,71	2,12
% RSD	5,62	2,21	3,08	2,33	5,62	2,21	3,08	2,33

ISO 3534-1(2006), kesinliği, öngörülen koşullar altında elde edilen bağımsız test sonuçları arasındaki yakınlığın (dağılıma derecesi) bir ölçüsü olarak tanımlar (öngörülen koşullar, örneğin, tekrarlanabilirlik, ara kesinlik veya tekrar üretilebilirlik). Gerekli hassasiyet, test sonuçlarının karar vermede oynayacağı role göre belirlenir. Not: "Bağımsız test sonuçları", aynı veya benzer test nesnesi üzerindeki önceki sonuçlardan etkilenmeyecek şekilde elde edilen sonuçlar

anlamına gelir; aynı zamanda test materyalleri bağımsız olarak hazırlanmıştır ve bu nedenle, ölçülen popülasyondan rastgele örnekler olarak kabul edilir.

Kesinlik genellikle standart sapma (daha az kesinlik daha büyük bir standart sapma ile yansıtılır) veya tekrarlanan sonuçların göreceli standart sapması (varyans katsayısı) gibi kesin olmayan ölçümlerle sayısal olarak ifade edilir.

Ancak diğer uygun önlemler de uygulanabilir. Belirtilen kesinliğin, yöntemin normal çalışma koşulları altındaki performansını gerçek anlamda yansıtabilmesi için, bu koşullar altında belirlenmesi gerekir (NATA,2012).

Kesinlik, ölçümlerin güvenilirliğini belirlemede önemli bir rol oynar ve dört temel faktöre bağlıdır. Zaman unsuru, kısa ve uzun vadede yapılan ölçümlerin tutarlılığını etkileyebilir; çevresel koşullardaki değişimler ölçüm sonuçlarını farklılaştırabilir. Kalibrasyon, aynı ekipmanla yapılan ölçümlerin tutarlılığını sağlamak için düzenli olarak yapılmalı, böylece sapmalar düzeltilmelidir. Operatör değişkenliği, farklı operatörler veya aynı operatörün farklı zamanlarda yaptığı ölçümler arasındaki tutarlılığı etkileyebilir. Son olarak, kullanılan ekipman, ölçüm sonuçlarının tutarlılığı üzerinde doğrudan etkilidir. Bu dört faktör, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çerçevesinde değerlendirilir (Yılmaz, 2012).

Eurachem rehberinde (2012), tekrarüretilebilirlik, laboratuvarlar arası (inter-laboratory) tekrar üretilebilirlik ve laboratuvar içi (intra-laboratory) tekrarüretilebilirlik olarak ikiye ayrılmıştır.

Eurachem rehberinde kesinlik için 10 tekrardan bahsederken TS ISO 5725-3 standardında en az 15 tekrar öngörülmüştür.

TÜRKAK'ın Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması için Bilgilendirme Kılavuzu (2023), kesinlik parametresinin hesaplanması sürecinde; kesinlik standart sapması basit tekrarlar içeren bir deneysel tasarım ile hesaplanabileceği gibi iç içe deney tasarımı (nested design) kullanılarak ANOVA ile de hesaplanabileceğini bildirmektedir. İç içe tasarım (nested design), karmaşık analizlerde farklı varyans bileşenlerini değerlendirmede etkili bir yöntemdir (Smith ve Chen, 2020).

Deney metodunun doğası gereği aynı gün içerisinde yeterli sayıda deney yapma imkânı yoksa kesinlik çalışmasında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik standart sapmalarını aynı anda vermesi nedeni ile ANOVA en etkili istatistiksel değerlendirme yöntemidir. Doğrulama amaçlı çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde ANOVA kullanılacaksa çalışmaya katılacak personelin tecrübesi göz önüne alınarak yeterli sayıda çalışma yapılması sağlanır.

Buradaki deney tasarımının günlük olarak (en az 2 tekrar ile) en az 5 gün yapılması önerilmektedir. Kuru incirde aflatoksin analizi verifikasyon çalışmasında düşük ve yüksek seviye olmak üzere 2 farklı toksin seviyesinde, 3 farklı laboratuvar personeli, 9 farklı günde her bir analiz 3'er paraleli olacak şekilde çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen veriler iç içe tasarım yönetimi kullanılarak tekrarlanabilirlik (RSD_r) ve tekrarüretilebilirlik (RSD_R) değerleri aynı anda ANOVA analizi yardımı ile hesaplanmıştır (Çizelge 9 ve Çizelge 10).

Farklı seviyelerde, ürün kategorilerinde, analitik partilerde vb. farklı koşullarda elde edilen, n sayıdaki ölçümlerin standart sapmaları ve/veya bağlı standart sapmaları aşağıdaki formüller (ve ANOVA testi öncesinde varyansların homojenliğinin uygun bir istatistiksel yaklaşımla, örneğin Cochran testi, ispatlanmak koşulu) ile birleştirilebilir (TÜRKAK, 2022).

Cochran testi, kategorik verilerin (örneğin, evet/hayır, kırmızı/mavi/yeşil gibi) bir grup içinde homojen dağılıp dağılmadığını test etmek için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Özellikle, bir örneklemin farklı alt gruplarında gözlenen frekansların eşit olup olmadığını değerlendirmek için kullanılır.

Burada sırasıyla her bir veri setine ait df ; serbestlik derecesini, s ; standart sapmasını, ve RSD ; bağlı standart sapmasını ve k ise toplam veri seti sayısını ifade eder. Elde edilen birleştirilmiş standart sapmanın toplam serbestlik derecesi ise $(1 + 2 + \dots +)$ 'dir. (TÜRKAK, 2022).

Varyans analizinin (ANOVA) arkasındaki temel fikir, tekrar analizlerinin örneğin, analist, cihaz, gün, laboratuvar, metot vb. gibi gruplanabilir, setteki toplam varyans, gruplar arası ve grup içi birleştirilmiş varyanslar (s^2) ile ifade edilebilir. ANOVA Şekil C.1'de gösterildiği gibi bir deneysel çalışma türü ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde kullanılabilir. Bu "iç içe tasarım" da, tekrar ölçümleri (tipik olarak tekrarlanabilirlik koşulları altında elde edilmiş) p grup veriyi sağlamak için değişik gözlemlerdeki ölçümlerle tekrarlanır. Ara kesinlik hesabı için bu tür bir çalışmada gözlemler arası koşullarda en yüksek varyasyon sağlanmalıdır (değişik günler, değişik analist vb.) (Magnusson ve Örnemark, 2014)

Çizelge 9. Düşük Seviye Kuru İncir Örneğinde Aflatoksin B₁ İstatistiksel Veri Analizi.

Analiz	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1
Matriks	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir
Kişi	1.Kişi	2.Kişi	3.Kişi	1.Kişi	2.Kişi	3.Kişi	1.Kişi	2.Kişi	3.Kişi	1.Kişi
Uygulama	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike
Seviye	1 ppb	1 ppb	1 ppb	1 ppb	1 ppb	1 ppb	1 ppb	1 ppb	1 ppb	1 ppb
1	0,921	0,902	0,890	0,906	0,931	0,912	0,899	0,932	0,794	
2	0,943	0,875	0,861	0,901	0,958	0,917	0,861	0,924	0,807	
3	0,910	0,874	0,858	0,900	0,937	0,907	0,855	0,900	0,788	
Ortalama	0,925	0,884	0,870	0,902	0,942	0,912	0,872	0,919	0,796	
Toplam Ortalama	0,891									
SD	0,0168	0,0159	0,0177	0,0032	0,0142	0,0050	0,0239	0,0167	0,0097	
T.SD	0,0433									
RSD	0,0182	0,0180	0,0203	0,0036	0,0151	0,0055	0,0274	0,0181	0,0122	
%RSD	1,82	1,80	2,03	0,36	1,51	0,55	2,74	1,81	1,22	
Varyans	0,000282	0,000252	0,000312	0,000010	0,000201	0,000025	0,000569	0,000277	0,000094	
Min.	0,910	0,874	0,858	0,900	0,931	0,907	0,855	0,900	0,788	
Max.	0,943	0,902	0,890	0,906	0,958	0,917	0,899	0,932	0,807	
Cochran Hesaplanan	0,281									
Cochran Kritik	0,871									
Varyans Homojenliği	UYGUN									
Tekrar. Sınırı(r) ="f"	3,300	0,055	0,052	0,058	0,011	0,047	0,017	0,079	0,055	0,032
Xmax-Xmin		0,033	0,028	0,032	0,006	0,027	0,010	0,044	0,032	0,019
Tekrar. Limit Değerlendirme		UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN
Grubbs Küçük Şüpheli		0,873	0,609	0,660	0,726	0,776	1,000	0,698	1,121	0,858
Grubbs Büyük Şüpheli		1,091	1,154	1,151	1,141	1,129	1,000	1,146	0,801	1,098
Grubbs Değerlendirme	1,155	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN
Sr-Tekrarlanabilirlik Standart Sapması		0,015								
SR- Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması		0,045								
%RSDr tekrarlanabilirlik		1,683								
%RSDR Tekrarüretilebilirlik		5,036								

Çizelge 9 düşük konsantrasyon seviyesindeki kuru incir örneklerinde yapılan aflatoksin B₁ analizine dair istatistiksel veriler sunulmuştur. Tekrarlanabilirlik standart sapması (Sr) 0,015 olarak belirlenmiş ve %RSD değeri 1,683 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, yöntemin düşük seviye konsantrasyonlarda tutarlı ve güvenilir ölçümler yapabildiğini göstermektedir. Ayrıca, tekrar üretilebilirlik standart sapması (SR) 0,045 ve %RSD değeri 5,036 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, yöntem performansının farklı operatörler ve cihazlar arasında bile uyumlu olduğunu doğrulamaktadır (Magnusson & Örnemark, 2014). Analiz sırasında elde edilen düşük standart sapma ve %RSD değerleri, metodun düşük aflatoksin seviyelerinde bile hassasiyet ve kesinlik açısından uygun olduğunu göstermektedir (TS 5822-2 ISO 5725-2, 2000).

Yüksek konsantrasyon seviyesinde yapılan analizlerde ise tekrarlanabilirlik standart sapması (Sr) ve tekrar üretilebilirlik standart sapması (SR) değerlerinin yüksek seviye konsantrasyonlarda artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 10).

Ancak, %RSD değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olması, metodun yüksek seviyelerde de güvenilir olduğunu göstermektedir. Bu durum, aflatoksin konsantrasyonunun yüksek olduğu örneklerde metodun tutarlı sonuçlar verdiğini ve analitik performansın değişmediğini ortaya koymaktadır.

Tekrarlanabilirlik (%RSD ≤ 2): Düşük seviyelerde %RSD değeri 2'nin altında kalarak, ölçümlerin tutarlı olduğunu kanıtlamaktadır [(ISO 3534-1, 2006)]. Tekrar Üretilebilirlik (%RSD ≤ 5): Yüksek seviyelerde %RSD değeri 5 civarında seyrederek, farklı koşullar altında metodun güvenilirliğini koruduğunu göstermektedir (Taylor, 1989).

Bu bulgular, metodun modifiye edilmiş versiyonunun orijinal yöntemle uyumlu olduğunu desteklemektedir (AOAC, 2003). Ayrıca, iç içe tasarımın farklı faktörlerin etkisini değerlendirme konusunda güçlü bir araç olduğunu ortaya koymaktadır (Anonim, 2018a).

Çizelge 10. Yüksek Seviye Kuru İncir Örneğinde Aflatoksin B₁ İstatistiksel Veri Analizi.

Analiz	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1	AFB1
Matriks	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir	İncir
Kişi	1.Kişi	2.Kişi	3.Kişi	1.Kişi	2.Kişi	3.Kişi	1.Kişi	2.Kişi	3.Kişi	1.Kişi
Uygulama	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike	Spike
Seviye	2 ppb	2 ppb	2 ppb	2 ppb	2 ppb	2 ppb	2 ppb	2 ppb	2 ppb	2 ppb
1	1,871	1,777	1,809	1,824	1,847	1,767	1,859	1,842	1,803	1,803
2	1,908	1,889	1,820	1,833	1,841	1,793	1,865	1,834	1,840	1,840
3	1,892	1,796	1,822	1,810	1,848	1,842	1,803	1,852	1,827	1,827
Ortalama	1,890	1,821	1,817	1,822	1,845	1,801	1,842	1,843	1,823	1,823
Toplam Ortalama	1,834									
SD	0,0186	0,0599	0,0070	0,0116	0,0038	0,0381	0,0342	0,0090	0,0188	0,0188
T.SD	0,0341									
RSD	0,0098	0,0329	0,0039	0,0064	0,0021	0,0211	0,0186	0,0049	0,0103	0,0103
%RSD	0,98	3,29	0,39	0,64	0,21	2,11	1,86	0,49	1,03	1,03
Varyans	0,000344	0,003592	0,000049	0,000134	0,000014	0,001450	0,001169	0,000081	0,000352	0,000352
Min.	1,871	1,777	1,809	1,810	1,841	1,767	1,803	1,834	1,803	1,803
Max.	1,908	1,889	1,822	1,833	1,848	1,842	1,865	1,852	1,840	1,840
Cochran Hesaplanan	0,500									
Cochran Kritik	0,871									
Varyans Homojenliği	UYGUN									
Tekrar. Sınırı(r) ="f"	3,300	0,061	0,198	0,023	0,038	0,012	0,126	0,113	0,030	0,062
Xmax-Xmin		0,037	0,112	0,013	0,023	0,007	0,075	0,062	0,018	0,037
Tekrar. Limit Değerlendirme		UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN
Grubbs Küçük Şüpheli		1,042	0,729	1,143	1,064	1,145	0,884	1,150	0,961	1,083
Grubbs Büyük Şüpheli		0,952	1,140	0,714	0,920	0,704	1,085	0,663	1,035	0,888
Grubbs Değerlendirme	1,155	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN	UYGUN
Sr-Tekrarlanabilirlik Standart Sapması		0,028								
SR- Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması		0,040								
%RSDr tekrarlanabilirlik		1,541								
%RSDR Tekrarüretilebilirlik		2,171								

Çizelge 11 de verilen kesinlik değerleri (sr ve sR) aşağıdaki denklemlerle hesaplanabilir:

1) Tekrarlanabilirlik standart sapması (Sr) "Gruplar İçinde Kareler Ortalamasının" kareköküne eşittir:

$$S_r = \sqrt{MS_w}$$

2) Gruplar Arasındaki varyansın (sb) toplam varyansa katkısı da ANOVA Tablosundan hesaplanabilir:

$$S_b = \sqrt{(MS_b - MS_w)/n}$$

3) Laboratuvar içi tekrar üretilirlik standart sapması (sR), yukarıdaki iki bileşenin (Gruplar içinde ve gruplar arasında varyansın) birleştirilmesi ile hesaplanabilir:

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_b^2}$$

ANOVA bir laboratuvarında uygulandığında deney metodunun tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik standart sapmalarının belirlenmesinde ve ayrıca ikiden fazla ölçüm dizisinin aritmetik ortalamaların karşılaştırılmasında kullanılabilir. Yukarıda verilen örnek deney metodunun kesinlik verilerini (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik) bulmaya amaçlamaktadır. Bu nedenle aritmetik ortalamaların karşılaştırılmasında uygunluk değerlendirme kriteri olan $F \leq F_{ölçütü}$ çıkması hali bu çalışmalarda aranmaz (TS 5822-1 ISO 5725-1, (2011), TS 5822-2 ISO 5725-2, (2000)).

İç içe tasarım (nested design) yöntemi kullanılarak yapılan bu istatistiksel analizler, analitik metodun hem düşük hem de yüksek seviyelerde güvenilir sonuçlar sağladığını göstermektedir. Bu yaklaşım sayesinde cihazlar, operatörler ve zaman faktörleri arasındaki varyasyonlar detaylı olarak incelenmiş ve metodun tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilirlik açısından yeterli olduğu doğrulanmıştır (TÜRKAK, 2023).

Çizelge 11. Tek etken ANOVA hesaplama formülleri (TÜRKAK, 2022).

Varyans Kaynağı	Karelerin Toplamı (SS)	Serbestlik derecesi (df)	Karelerin Ortalaması (MS)	F	P	F _{kritik}
Gruplar arasında	SS _b	p-1	MS _b = SS _b / (p-1)	MS _b /MS _w		
Gruplar içinde	SS _w	N-p	MS _w = SS _w / (N-p)			
Toplam	SS _T = SS _b + SS _w	N-1				

Çizelge 12, düşük seviyedeki aflatoksin B1 konsantrasyonlarında metodun tekrarlanabilirlik (Sr) ve tekrar üretilebilirlik (SR) değerlerini sunmaktadır. Tekrarlanabilirlik standart sapması (Sr) 0,015 ve tekrar üretilebilirlik standart sapması (SR) 0,045 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, yöntemin düşük seviyeli konsantrasyonlarda güvenilir ölçümler yaptığını göstermektedir. Ayrıca, %RSD_r (tekrarlanabilirlik için bağlı standart sapma) 1,683 ve %RSD_R (tekrar üretilebilirlik için bağlı standart sapma) 5,036 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar, uluslararası standartlara göre kabul edilebilir sınırlar içindedir (TS 5822-3 ISO 5725-3, 2000).

Çizelge 12. Düşük Seviye Kuru İncir Örneğinde Aflatoksin B1 İç İçe Tasarım Yöntemi ile RSD_r ve RSD_R Değerlerinin Hesaplanması.

Sr-Tekrarlanabilirlik Standart Sapması	$S_r = \sqrt{MS_w}$	0,015
SR-Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması	$S_R = \sqrt{(MS_b - MS_w)/n}$	0,045
%RSD _r tekrarlanabilirlik	$\%RSD_r = S_r / \text{Ortalama}$	1,683
%RSD _R Tekrarüretilebilirlik	$\%RSD_R = S_R / \text{Ortalama}$	5,036

4. Sonuç

İç içe tasarım yaklaşımını analitik metot verifikasyonunda uygulamak, metodolojinin farklı koşullar altındaki robustluğunu (güçlülüğünü) ve güvenilirliğini değerlendirmede önemli bir araçtır. Bu yaklaşım, özellikle karmaşık testlerin ve analizlerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak için kritik öneme sahiptir.

Her seviyede elde edilen veriler, bir sonraki seviyenin tasarımına ve değerlendirmesine katkıda bulunur. Örneğin, cihaz performansındaki bir sorun, sonraki seviyelerdeki testleri etkileyebilir. Bu nedenle, her seviyenin başarılı olması önemlidir.

Bu yaklaşım, kimyasal analiz yöntemlerinin güvenilirliğini sağlamak için sistematik bir süreç sağlar. Ancak, her yöntem ve uygulama alanı için spesifik gereksinimler ve toleranslar göz önünde bulundurulmalıdır.

Analitik metot verifikasyonunda iç içe tasarım kullanımının avantajları şunlardır:

1. Daha Derinlemesine Analiz: Metodun farklı koşullar altında nasıl performans gösterdiğini detaylı bir şekilde analiz etme imkânı sunar.
2. Faktör Etkileşimlerinin Belirlenmesi: Farklı faktörlerin (cihaz, operatör, numune türü vb.) sonuçlar üzerindeki etkileşimlerini değerlendirme olanağı sağlar.
3. Etkin Kaynak Kullanımı: Veri toplama ve analiz süreçlerinde kaynakları daha etkin kullanmayı mümkün kılar, çünkü iç içe tasarım veri toplama işlemini daha sistematik hale getirir.
4. Veri Yorumlama: Veri seti içindeki değişkenler arasındaki ilişkilerin daha net bir şekilde yorumlanmasına yardımcı olur.

Bu çalışmada, kuru incir numunelerinde aflatoksin analizine yönelik modifiye edilen analitik metot, iç içe tasarım (nested design) yaklaşımı ile doğrulanmıştır. Metot verifikasyonu, yöntemin hassasiyet, doğruluk, kesinlik, LOD (saptama sınırı) ve LOQ (kantitasyon sınırı) gibi temel parametreler açısından uygun olduğunu göstermiştir. Modifiye edilen yöntem ile orijinal yöntem arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar, iki yöntemin sonuçlarının uyumlu olduğunu ve modifiye yöntemin güvenilir olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, nested design yaklaşımıyla, cihaz ve operatör gibi farklı faktörlerin varyans üzerindeki etkileri ayrıntılı şekilde değerlendirilmiş, yöntemin farklı koşullarda tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği kanıtlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar, kuru incir gibi matris etkisinin yüksek olduğu ürünlerde bile yöntemin güvenilir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir. Metodun hem düşük hem de yüksek aflatoksin seviyelerinde doğruluk ve hassasiyet açısından etkin olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, modifiye edilen analitik yöntemin, yasal limitlerin değerlendirilmesinde ve aflatoksin analizinde rutin kullanım için uygun olduğunu

ortaya koymaktadır. Çalışma, metot verifikasyonu süreçlerinde iç içe tasarım yaklaşımının kullanılabilirliğini ve avantajlarını vurgularken,

5. References

Anonim, 2023. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 05 Kasım 2023 tarih ve 32360 sayılı Resmî Gazete, Ankara.

Anonim, 2018a. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve fiziksel analizlerde metot validasyon/verifikasyon rehberi https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf (Erişim: 27.03.2024)..

Anonim, 2018b. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve fiziksel analizlerde ölçüm belirsizliği rehberi https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf (Erişim: 27.03.2023)..

AOAC, 2003. Official Methods of Analysis. 21th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA

B. Magnusson and U. Örnemark, 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from <http://www.eurachem.org>

EURACHEM/CITAC Guide. (2012). *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 3rd Edition.

FAO and WHO. 2023. *Codex Alimentarius Commission Procedural Manual*. Twenty-eighth edition, revised. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc5042en>

ISO, 2006. ISO 3534-1: 2006. Statistics–Vocabulary and symbols–Part 1: General statistical terms and terms used in probability.

NATA, 2012. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, National Association of Testing Authorities Technical Note.

Rao, P. S., & Srinivas, S. P., 2015. Analytical method validation and method transfer in pharmaceuticals. In S. P. Srinivas (Ed.), *Pharmaceutical Analytical Chemistry* (pp. 23–42).

güvenilir analiz sonuçları elde etmek için laboratuvarlar arası standartlaştırılmış bir temel sunmaktadır.

Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158097000021>

Smith, J. A., & Chen, L., 2020. Nested design for variance component analysis in method validation. *Accreditation and Quality Assurance*, 25(3), 231–239. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00769-020-01446-5>

Taylor, J.K., *Quality Assurance of Chemical Measurements*, sixth edition, Lewis Publishers, ISBN 0-87371-097-5, 1989, page 79.

TS 5822-1 ISO 5725-1, 2011. *Ölçme metotlarının ve sonuçlarının doğruluğu (gerçeklik ve kesinlik) - Bölüm 1: Genel Prensipler ve tarifler*, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

TS 5822-2 ISO 5725-2, 2000. *Ölçme metotlarının ve sonuçlarının doğruluğu (gerçeklik ve kesinlik) - Bölüm 2: Standart bir ölçme metodunun tekrarlanabilirliği ve uyarlığın tayini için temel metot*, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

TS 5822-3 ISO 5725-3, 2000. *Ölçme metotlarının ve sonuçlarının doğruluğu (gerçeklik ve kesinlik) - Bölüm 3: Standard bir ölçme metodunun kesinliğinin ara ölçmeleri*, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

TS EN ISO/IEC 17025, 2017. *Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yetkinliği için genel gereklilikler*, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Türk Akreditasyon Kurumu, TÜRKAK, 2022. *Metodun geçerli kılınması ve doğrulanması için bilgilendirme kılavuzu*, Türk Akreditasyon Kurumu, Ankara.

Türk Akreditasyon Kurumu, TÜRKAK, 2023. *Uygunluk değerlendirme kuruluşlarının akreditasyonu prosedürü*, Türk Akreditasyon Kurumu, Ankara.

Yılmaz, A. 2012. Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu. *Turklab Rehber*, (01).

Williams, C., & Zhao, Y. 2019. Aflatoxin determination in food samples: Methods and applications. *Toxins*, 11(7), 401